

539, 879

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



Rec'd PCT/PTC 13 JUN 2005



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/054597 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 35/78

PAULY, Gilles [FR/FR]; 5, rue des Begonias, F-54000 Nancy (FR). CHARROUF, Zoubida [MA/MA]; Avenue Ibn Batouta, B.P. 1014, Rabat R.P. (MA).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013921

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Dezember 2003 (09.12.2003)

(74) Anwalt: FABRY, Bernd; Cognis Deutschland GmbH & Co. KG, Postfach 13 01 64, 40551 Düsseldorf (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, KR, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
02293130.7 18. Dezember 2002 (18.12.2002) EP

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): COGNIS FRANCE S.A. [FR/FR]; Boussens, F-31360 Saint-Martory (FR).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HENRY, Florence [FR/FR]; 1, allée Jean Antoine Baif, F-54600 Villers-les-Nancy (FR). DANOUX, Louis [FR/FR]; 12, rue de Bretagne, F-54420 Saulxures Les Nancy (FR).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2004/054597 A1

(54) Title: USE OF AN EXTRACT FROM THE PLANT *ARGANIA SPINOSA*

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES EXTRAKTES AUS DER PFLANZE *ARGANIA SPINOSA*

(57) Abstract: The invention relates to the use of extracts from the plant *Argania spinosa* in the production of anti-acne agents, preparations for combating seborrhoea and agents for combating 5-alpha reductase activity, said extract containing proteins and saponins, in particular arganine A.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird die Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Anti-Akne-Mitteln, Zubereitungen gegen Seborrhoe und Mitteln anti-5-alpha-reductase-Aktivität, wobei der verwendete Extrakt Proteine und Saponine, insbesondere Arganin A enthält.

Verwendung eines Extraktes aus der Pflanze *Argania spinosa*

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der kosmetischen und/oder dermatopharmazeutischen Pflegestoffe und betrifft die Verwendung von Extrakten der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Mitteln gegen Akne und/oder Seborrhoe, sowie Zubereitungen mit anti-5-alpha-Reductase-Aktivität.

Stand der Technik

Fettige und durch Akne befallene Haut zeigt eine erhöhte Sekretion von Hautfett und Talg durch die übermäßige Aktivität der Talgdrüsen. Die in den Ausscheidungen der Talgdrüsen enthaltenen Triglyceride werden auf der Haut durch Lipasen verschiedener Mikroorganismen wie beispielsweise *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* und *Pytirosporum* ovale zersetzt und freie Fettsäuren werden abgespalten. Einige dieser freien Fettsäuren führen zu den charakteristischen entzündlichen Phänomenen des akuten Akne-Stadiums.

Die Transformation von Testosteron in 5-dihydrotestosterone (5-DHT) durch das Enzym 5-alpha-Reduktase hat sich als eine der Ursachen für die vermehrte Talgdrüsensekretion herausgestellt. Daher ist die Aktivität des Enzymes 5-alpha-Reduktase, das insbesondere in den Talgdrüsen und in apokrinen Drüsen, sowie in Keratinocyten und Fibroblasten nachzuweisen ist, von besonderer Wichtigkeit für die Haut, die durch Akne oder Seborrhoe ausgezeichnet ist.

Kosmetische Zubereitungen stehen dem Verbraucher heute in einer Vielzahl von Kombinationen zur Verfügung. Dennoch besteht im Markt das Bedürfnis nach Produkten mit einem verbesserten Leistungsspektrum. Hierbei sind Hautverträglichkeit sowie der Einsatz natürlicher Produkte beim Kunden gefragt. Daneben ist es wünschenswert, durch Kombination bereits bekannter Wirkstoffe, oder durch auffinden neuer Einsatzgebiete bereits bekannter Substanzklassen deutlich bessere Produkte zu erhalten. Besonders Extrakte von Pflanzen und deren Inhaltstoffe finden immer häufiger Einsatz in der Kosmetik und Pharmazie. Es sind jedoch viele Pflanzen und ihre potentielle Wirkung noch nicht gefunden worden und viele neue Anwendungsgebiete bereits bekannter Substanzklassen sind immer wieder überraschend.

Seit langem ist bekannt, dass viele Saponine, die aus den unterschiedlichsten Pflanzen und Mikroorganismen gewonnen werden, eine anti-radikalische, analgetische und auch anti-inflammatorische Wirkung zeigen. Diese Wirkung konnten Alaoui et al. auch für die aus *Argania spinosa* isolierten Saponine nachweisen [Alaoui K. et al.; *Annales pharmaceutique francaices*, 1998, 56, 220-228.]. Es wurde außerdem für einige Saponine eine antibiotische und eine fungistatische Wirksamkeit gefunden. Saponine, speziell die Triterpen-Saponine sind aus einem tetra- oder pentacyclischen Triterpen-Aglykon und einer oder zwei glycosidisch gebundenen Zuckerketten aufgebaut.

Die Aufgabe der vorliegenden Patentanmeldung hat darin bestanden, neue Anwendungen für gut verträgliche wirkstoffreiche Extrakte aus nachwachsenden pflanzlichen Rohstoffen zu finden, wobei insbesondere Aktivstoffe zur Behandlung Akne-befallener und seborrhoischer Haut gesucht wurden.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* (L.) Skeels, im weiteren nur als *Argania spinosa* bezeichnet, zur Herstellung von Anti-Akne-Mitteln, zur Herstellung von Zubereitungen gegen Seborrhoe, sowie zur Herstellung von Zubereitungen mit anti-5-alpha-reductase-Aktivität.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass durch den Einsatz von Extrakten der Pflanze *Argania spinosa* Zubereitungen hergestellt werden können, die eine hervorragende Wirkung in Anti-Akne-Mitteln und Zubereitungen gegen Seborrhoe aufweisen und gleichzeitig eine hohe Hautverträglichkeit besitzen. Sie sind daher hervorragend gegen fettige Haut, Akne-Haut und fettige Kopfhaut auch bei sensiblen Hauttypen einzusetzen. Die hergestellten Zubereitungen zeigen eine deutliche anti-5-alpha-Reductase-Aktivität. Daraus ergibt sich eine besondere Ausführungsform der Erfindung in der Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Zubereitungen zur Behandlung von unerwünschtem Haarwuchs bei Frauen, insbesondere von unerwünschtem Haarwuchs, der nach der Menopause auftritt. Dieser unerwünschte Haarwuchs tritt insbesondere auf im Gesicht, vor allem in der Mundpartie oder auf den Beinen. Der unerwünschte, übermäßige Haarwuchs bei Frauen, insbesondere nach der Menopause, wird mit einer Hyperaktivität von 5-alpha Reductase in Verbindung gebracht. Der unerwünschte, oft übermäßige Haarwuchs in bestimmten Gesichtspartien oder auf den Beinen kann somit durch Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* wirksam gehemmt werden.

Argania spinosa

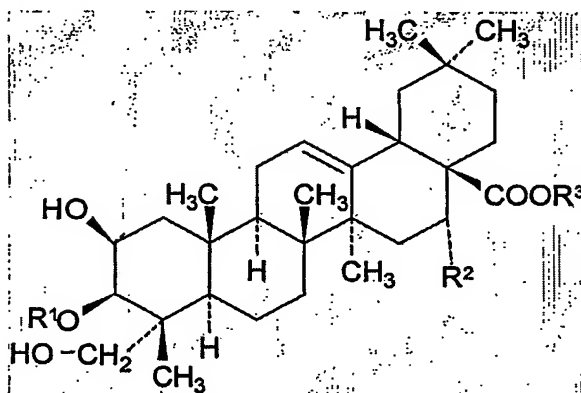
Die erfindungsgemäß einzusetzenden Extrakte werden aus Pflanzen der Familie der Sapotaceae, speziell aus *Argania spinosa* (L.) Skeels, im weiteren nur als *Argania spinosa* bezeichnet, gewonnen. Bei dieser Pflanze handelt es sich um einen Baum, der überwiegend in Marokko an der Westseite des Atlasgebirges zu finden ist. Er bildet an seinen knorrigen Ästen und bedornen Zweigen Beeren von der Größe und Gestalt der Oliven mit ein bis zwei Samenkernen. Das nussartig schmeckende Öl aus den Samenkernen dient unter anderem als Speiseöl.

Unter dem Begriff Pflanze im Sinne der vorliegenden Anmeldung sind sowohl ganze Pflanzen als auch Pflanzenteile (Blätter, Wurzeln, Stamm, Rinde, Blüten, Früchte, Fruchtfleisch und Samenkern) sowie deren Gemische zu verstehen. Besonders bevorzugt zur Extraktion der Saponine im Sinne der Erfindung sind die Samenkern der Frucht dieser Pflanze insbesondere die Extraktion des Rückstands aus den entfetteten Samenkernen.

Saponine

Unter Saponinen sind im Sinne der Erfindung grundsätzlich alle Saponine zu verstehen, die sich aus der Pflanze *Argania spinosa* isolieren lassen.

Aus dem Rückstand, der bei der Ölgewinnung aus den Samenkernen von *Argania spinosa* anfällt, werden Saponine erhalten, die sich in der Struktur von Saponinen aus anderen Pflanzen unterscheiden [Charrouf Z., et al.; *Phytochemistry*, 1992, 31; 2079-2086.]. Es handelt sich hier um Saponine mit der Bezeichnung Arganin A, Arganin B, Arganin C, Arganin D, Arganin E, Arganin F und Misaponin A. Aus dem Stamm der Pflanze können die einsetzbaren Saponine Arganin G, Arganin H, und Arganin J [Oulad-Ali A., et al.; *J. Nat. Prod.*; 1996, 59, 193-195.] isoliert werden. Das Aglycon dieser Saponine weist die im Folgenden dargestellte Struktur (I) auf, die genannten Saponine unterscheiden sich jeweils in den Zuckereinheiten an R1 und R3 bzw. durch eine Hydroxygruppe an R2. Bei R3 handelt es sich um ein Tetrasaccharid und bei R1 jeweils um ein Mono- oder Disaccharid (z. B. 1,6-Diglukose für Arganin A und B).



Die erfindungsgemäßen Saponine zeigen in toxikologischen Test an Mäusen und Ratten eine geringe Toxizität. Im Vergleich zu anderen Saponinen wie z.B. aus *Gypsophila paniculata* konnten die Erfinder auch durch Tests an humanen Fibroblasten eine wesentlich geringere Toxizität nachweisen.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Saponine entsprechen Arganin A, Arganin B, Arganin C, Arganin D, Arganin E, Arganin F, Misaponin A, sowie Arganin G, Arganin H, und Arganin J. Sie können als Gemisch von zwei oder mehr, oder als Reinsubstanz in der kosmetischen und oder pharmazeutischen Zubereitung Anwendung finden. Besonders bevorzugt sind Mischungen aus Arganin A, Arganin B, Arganin C, Arganin D, Arganin E, Arganin F, Misaponin A, wobei die Anteile der Saponine in den Mischungen variieren können. Vorzugsweise werden Extrakte eingesetzt, die eine hohe Menge an Arganin A enthalten. Die erfindungsgemäße Verwendung von Extrakten mit mindestens 6 Gew. %, vorzugsweise 8 Gew.% und insbesondere mindestens 10 Gew. % an Arganin A – bezogen auf das Trockengewicht des Extraktes - haben sich durch ihre besonders ausgeprägten Wirkungen ausgezeichnet.

Proteine

Unter Proteinen sind im Sinne der Erfindung solche zu verstehen, die sich aus der Pflanze *Argania spinosa* isolieren lassen. Bevorzugt ist die Extraktion der Samenkerne, insbesondere der entfetteten Samenkerne nach der Ölextraktion. Dementsprechend ist eine besondere Ausführungsform der Erfindung Zubereitungen, die native Proteine enthalten, die erhalten werden aus einem Extrakt der Samenkerne, insbesondere der entfetteten Samenkerne von *Argania spinosa*.

Unter der bevorzugten Extraktion der entfetteten Samenkerne ist im Sinne der Erfindung zu verstehen, dass bevorzugt der Rückstand – eine Art Kuchen – aus der Extraktion zur Ölgewinnung aus den Samenkernen von *Argania spinosa* extrahiert wird. Dieser bevorzugt zu extrahierende Rückstand aus der Extraktion zur Ölgewinnung enthält 3 bis 10 Gew.-% restliches Öl. Aus diesem Rückstand werden die erfindungsgemäßen Proteine vom noch verbliebenen Öl möglichst vollständig getrennt. Neben Proteinen können noch weitere, natürlich in den Pflanzen *Argania spinosa* vorkommende Substanzen mit extrahiert werden, die unter den gleichen Bedingungen extrahierbar sind.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthalten die erfindungsgemäßen Zubereitungen native Proteine, die durch wässrige Extraktion bei einem pH-Wert geringer oder gleich 12, bevorzugt zwischen 3,5 und 6,5, insbesondere entweder zwischen 5,5 und 6,5 oder zwischen 3,5 und 5,5 und gegebenenfalls einer anschließenden Trocknung,

beispielsweise einer Sprüh- oder Gefriertrocknung erhalten werden. Der gewählte pH-Wert Bereich ist abhängig von der zu isolierenden Proteinfraktion.

Die nativen Proteine, die sich aus der Pflanze *Argania spinosa*, insbesondere aus den Samenkernen der Pflanze extrahieren lassen, können Molekulargewichte zwischen 10.000 Da und größer als 500.000 Da besitzen. Bevorzugt können sie eingeteilt werden in folgende Gruppen von Molekulargewichtsbereichen. Extrahiert werden können native Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 500.000 Da, native Proteine mit Molekulargewicht im Bereich von 170.000 bis 250.000 Da und native Proteine mit Molekulargewicht im Bereich von 10.000 bis 18.000 Da.

Demnach betreffen weitere Ausführungsformen der Erfindung zum einen Zubereitungen, die native Proteine enthalten, deren Molekulargewicht größer als 500.000 Da beträgt, Zubereitungen, die native Proteine enthalten, deren Molekulargewicht im Bereich von 170.000 Da bis 250.000 Da, bevorzugt im Bereich von 170.000 Da bis 210.000 Da liegt und Zubereitungen, die native Proteine enthalten, deren Molekulargewicht im Bereich von 10.000 bis 18.000 bevorzugt im Bereich von 13.000 bis 16.000 liegt.

Bevorzugt soll der Anteil an Proteinen im erfindungsgemäß eingesetzten Extrakt mindestens 3 Gew. %, vorzugsweise mindestens 4 Gew. % und insbesondere mindestens 5 Gew. % - bezogen auf das Trockengewicht des Extraktes - betragen

Extraktion

Die Herstellung der erfindungsgemäß einzusetzenden Extrakte erfolgt durch übliche Methoden der Extraktion von Pflanzen bzw. Pflanzenteilen. Bezüglich der geeigneten herkömmlichen Extraktionsverfahren wie der Mazeration, der Remazeration, der Digestion, der Bewegungsmazeration, der Wirbelextraktion, Ultraschallextraktion, der Gegenstromextraktion, der Perkolation, der Reperkolation, der Evakolation (Extraktion unter vermindertem Druck), der Diakolation und Festflüssig-Extraktion unter kontinuierlichem Rückfluß, die in einem Soxhlet-Extraktor durchgeführt wird, die dem Fachmann geläufig und im Prinzip alle anwendbar sind, sei beispielhaft auf **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**, (5. Auflage, Bd. 2, S. 1026-1030, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York 1991) verwiesen. Als Ausgangsmaterial können frische oder getrocknete Pflanzen oder Pflanzenteile eingesetzt werden, üblicherweise wird jedoch von, entfetteten Pflanzen und/oder Pflanzenteilen ausgegangen, die vor der Extraktion mechanisch zerkleinert werden können. Hierbei eignen sich alle dem Fachmann bekannten Zerkleinerungsmethoden, als Beispiel sei die Zerstoßung mit einem Mörser genannt. In einer besonderen Ausführungsform werden die verwendeten Extrakte erhalten durch Extraktion des

Stammes, der Wurzel, der Blätter, der Blüte oder der Früchte. Besonders bevorzugt ist die Extraktion der Samenkerne.

Als Lösungsmittel für die Durchführung der Extraktionen können vorzugsweise organische Lösungsmittel, Wasser oder Gemische aus organischen Lösungsmitteln und Wasser, insbesondere niedermolekulare Alkohole, Ester, Ketone oder halogenhaltige Kohlenwasserstoffe mit mehr oder weniger hohen Wassergehalten (destilliert oder nicht destilliert) vorzugsweise wässrig, alkoholische Lösungen einer Temperatur von über 20 °C, (im nachfolgenden als Raumtemperatur bezeichnet), verwendet werden. Besonders bevorzugt ist die Extraktion mit Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Propylenglycolen, Polyethylenglycolen Ethylacetat, Dichlormethan, Trichlormethan sowie Mischungen hieraus. Die Extraktion erfolgt in der Regel bei 20 bis 100 °C, bevorzugt bei 20 bis 85°C, insbesondere bei Raumtemperatur. In einer möglichen Ausführungsform erfolgt die Extraktion unter Inertgasatmosphäre zur Vermeidung der Oxidation der Inhaltsstoffe des Extraktes. Die Extraktionszeiten werden vom Fachmann in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial, dem Extraktionsverfahren, der Extraktionstemperatur, vom Verhältnis Lösungsmittel zu Rohstoff u.a. eingestellt. Nach der Extraktion können die erhaltenen Rohextrakte gegebenenfalls weiteren üblichen Schritten, wie beispielsweise Aufreinigung, Konzentration und/oder Entfärbung unterzogen werden. Falls wünschenswert, können die so hergestellten Extrakte beispielsweise einer selektiven Abtrennung einzelner unerwünschter Inhaltsstoffe, unterzogen werden. Die Extraktion kann bis zu jedem gewünschten Extraktionsgrad erfolgen, wird aber gewöhnlich bis zur Erschöpfung durchgeführt. Typische Ausbeuten (=Trockensubstanzmenge des Extraktes bezogen auf eingesetzte Rohstoffmenge) bei der Extraktion getrockneter Pflanzen oder getrockneter Pflanzenteile gegebenenfalls entfettet, liegen im Bereich von 3 bis 20, insbesondere 4 bis 16 Gew.-%. Die vorliegende Erfindung umfasst die Erkenntnis, dass die Extraktionsbedingungen sowie die Ausbeuten der Endextrakte je nach gewünschtem Einsatzgebiet gewählt werden können. Falls gewünscht, können die Extrakte anschließend beispielsweise einer Sprüh- oder Gefriertrocknung unterworfen werden.

Erfindungsgemäß enthalten die Extrakte dieser Pflanze 10 bis 99 Gew.-% Saponine, vorzugsweise 15 bis 70 Gew.-%. Die Einsatzmenge der Pflanzenextrakte in den Anti-Akne-Mitteln und Zubereitungen gegen Seborrhoe, sowie Zubereitungen mit anti-5-alpha-reductase-Aktivität richtet sich nach der Konzentration der einzelnen Inhaltsstoffe. Die Gesamtmenge des Pflanzenextraktes, der in den Zubereitungen enthalten ist, beträgt in der Regel 0,01 bis 25 Gew.-%, vorzugsweise 0,03 bis 5 Gew.-%, insbesondere 0,03 bis 0,4 Gew.-% bezogen auf die Endzubereitung.

Vorzugsweise enthalten die eingesetzten Pflanzenextrakte Proteine und Saponine in den beschriebenen Mengengebieten in Kombination.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Kosmetische und/oder pharmazeutische Zubereitungen

Die Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Anti-Akne-Mitteln, Zubereitungen gegen Seborrhoe, sowie Zubereitungen mit anti-5-alpha-Reductase-Aktivität resultiert in kosmetischen und/oder pharmazeutischen Zubereitungen wie beispielsweise Cremes, Gelen, Lotionen, alkoholischen und wäßrig/alkoholischen Lösungen, Emulsionen, Haarshampoos, Haarlotionen, Schaumbädern, Duschbädern, Wachs/ Fett-Massen, Stiftpräparaten, Pudern oder Salben. Diese Mittel können ferner als weitere Hilfs- und Zusatzstoffe milde Tenside, Ölkörper, Emulgatoren, Perlglanzwachse, Konsistenzgeber, Verdickungsmittel, Überfettungsmittel, Stabilisatoren, Polymere, Siliconverbindungen, Fette, Wachse, Lecithine, Phospholipide, biogene Wirkstoffe, UV-Lichtschutzfaktoren, Antioxidantien, Filmbildner, Quellmittel, Hydrotrope, Solubilisatoren, Konservierungsmittel, Parfümöle, Farbstoffe und dergleichen enthalten.

Der Gesamtanteil der Hilfs- und Zusatzstoffe kann 1 bis 70, vorzugsweise 20 bis 50 und insbesondere 5 bis 40 Gew.-% - bezogen auf die Endzubereitung der kosmetischen und/oder pharmazeutischen Zubereitungen - betragen. Die Herstellung der Zubereitungen kann durch übliche Kalt - oder Heißprozesse erfolgen; vorzugsweise arbeitet man nach der Phaseninversionstemperatur-Methode.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung des Saponin-Rohextraktes

0.3 kg eines *Argania spinosa* Kuchens (aus den Samen nach der Ölextraktion) wurden mit 1,98 kg Hexan entfettet (1 Stunde bei 80°C). Der entfettete Kuchen wurde nachfolgend bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet.

0,12 kg des entfetteten und getrockneten Kuchens wurden in einem Rührgefäß mit 2 l 80 Vol.% Ethanol aufgefüllt. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur über 16 Stunden gerührt. Danach wurden die Feststoffe durch Filtration entfernt. Die gefilterte Lösung bildet den Rohextrakt aus dem Ethanol durch Evaporieren entfernt wurde. Abschließend wurde der Rückstand durch Lyophilisation getrocknet.

Prinzip des Tests

Rekonstruierte Epidermis enthält vergleichbar zur lebenden Haut den gesamten enzymatischen Mechanismus der zur Metabolisierung von Testosteron benötigt wird. Der Versuchsansatz mit rekonstruierter Epidermis *in vitro* ist angemessener, da die 5-alpha Reductase in einem biologischem System verbleibt, welches dem *in vivo* System sehr nahe kommt und was durch gereinigte Enzyme nicht realisiert werden kann. Des weiteren ist dieser Versuchsansatz angemessen, da die Keratinocyten im Stadium der Differentiation dem *in vivo*-Test näher kommen, als wenn Keratinocyten in Monolayers verwendet werden. [Bernard F-X et al, 2000, *Int. J. Cosmetic Science*, 22, 397-407, Expression of type 5-alpha-reductase and metabolism of testosterone in reconstructed human epidermis - SkinEthic: a new model for screening skin targeted androgen modulators]

Testaufbau:

Material:

Epidermis SkinEthic (17 Tage, 0.63 cm²) in Kultur, 37°C, 5% CO₂

Referenz - Substanz: Finasteride

Testosterone: [4-¹⁴C] Testosterone (Amersham, CFA129, 56 mCi/mmole), 250 nCi/Epidermis

Extrakt von *Argania* Saponinen gemäß Beispiel 1

Behandlung:

Die Epidermis wurde vorkultiviert auf Platten mit 24 Positionen für 24 Stunden. Die Untersuchungen mit den Produkten und der Referenzsubstanz Finasterid (10 μ M) wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt (3 Epidermisansätze pro Experiment). Nach 24-stündiger Behandlung wurden die Medien der Subepidermis erneuert und durch 300 μ l frisches Kulturmedium ausgetauscht. 100 μ l radioaktiv markierter Testosteronlösung wurde auf die Oberseite (Hornhaut) der Epidermis aufgetragen (TO). Nach weiteren 24 Stunden wurde das Subepidermis-Medium für die Analyse entnommen.

Die Lebensfähigkeit der Keratinocyten in den unterschiedlichen Epidermisproben wurde am Ende des Versuches mit der MTT-Methode untersucht.

Extraktion und Analyse:

Um die transepidermale Diffusion zu bestimmen wurden je 20 μ l jedes Kulturmediums entnommen und im Liquid Scintillationszähler gezählt.

Die im Kulturmedium enthaltenen Steroide wurden für die Analyse des Metabolismus extrahiert und dünnschichtchromatographisch (auf Kieselgel) in ihre molekularen Derivate getrennt. Die Menge an transformiertem Testosteron wurde durch radioaktive Zählung der unterschiedlichen Spots mit einem Phosphorimager ermittelt.

Ergebnisse:

Die Überlebensfähigkeit der behandelten Epidermis und die transepidermale Diffusion sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Table 1: Diffusion von 14 C-Testosterone (und Metaboliten) durch rekonstruierte humane Epidermis (SkinEthic) und Überlebensfähigkeit des Gewebes am Ende des Versuches (t=24 Stunden)

Behandlung	% 14 C-Testosterone	Nmole Steroid	Überlebensrate in %
Total Testosterone	/	4.5	/
Kontrolle	100	2.2	100
Finasterid 10 μ M	110	2.4	101
Extrakt gemäß Beispiel 1 Argania			
0.003%	98	2.2	98
0.001%	100	2.2	101

Die Überlebensfähigkeit unbehandelter Epidermis (Kontrolle) und mit Finasterid behandelter Epidermis war identisch mit den durch Extrakt-behandelten Proben (2 Konzentrationen).

Für die transepidermale Diffusion wurde ungefähr ein Mittel der initialen Radioaktivität im Kulturmedium nach 24 Stunden Inkubation nachgewiesen. Die Behandlung mit Finasterid führte zu einem geringfügigen Anstieg der Diffusion von Steroiden durch die Epidermis (110% der Kontrolle).

Der untersuchte Extrakt jedoch hat die Diffusion von Steroiden durch die Epidermis nicht beeinflusst (Werte zwischen 98 und 100% der Kontrolle).

Die Metabolisierung von Testosteron ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Table 2: Einfluß der Behandlung mit Argania Extrakt auf die Produktion von DHT. Analyse durch Phosphorimager im Zusammenhang mit der angefallenen Radioaktivität

Behandlung	Entstandenes DHT in %
Kontrolle	100
Finasterid 10 µM	8
Extrakt von Argania Saponinen gemäß Beispiel 1	
0.001%	61%
0.003%	74%

Der untersuchte Extrakt zeigt eine deutliche Verminderung der Produktion an DHT – 39 und 26 % Inhibierung. In einer Konzentration von 0,001 Ge. % ist bereits eine signifikante Inhibierung der 5-alpha-Reduktase Aktivität zu detektieren ohne dass dabei toxische Effekte die Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflussen (bestimmt im MTT-Test).

Patentansprüche

1. Verwendung von Extrakten aus der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Anti-Akne-Mitteln.
2. Verwendung von Extrakten der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Zubereitungen gegen Seborrhoe.
3. Verwendung von Extrakten der Pflanze *Argania spinosa* zur Herstellung von Zubereitungen mit anti-5-alpha-Reductase-Aktivität.
4. Verwendung von Extrakten der Pflanze *Argania spinosa* nach Anspruch 3 zur Herstellung von Zubereitungen mit anti-5-alpha-Reductase-Aktivität zur Behandlung von unerwünschtem Haarwuchs bei Frauen, insbesondere von unerwünschtem Haarwuchs, der nach der Menopause auftritt.
5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Extrakte Proteine und/oder Saponine enthalten.
6. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Extrakte Saponine enthalten, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von Arganin A, Arganin B, Arganin C, Arganine D, Arganin E, Arganin F, Arganin G, Arganin H, Arganin J und Misaponin A.
7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Extrakte als Saponin Arganin A in Mengen von mindestens 6 Gew.% bezogen auf das Trockengewicht des Extraktes enthalten.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Extrakte mindestens 3 Gew.% an Proteinen bezogen auf das Trockengewicht des Extraktes enthalten.
9. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Extrakte in Mengen von 0,01 bis 25 Gew.-% berechnet als Trockengewicht, bezogen auf die Mittel, eingesetzt werden.
10. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Extrakt erhalten wird durch Extraktion von Pflanzenteilen, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird aus den Blättern, den Wurzeln, dem Stamm, der Rinde, den Blüten, den Früchten, dem Fruchtfleisch und den Samenkernen.
11. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Extrakt erhalten wird durch Extraktion der Samensterne und/oder der entfetteten Samensterne aus der Frucht der Pflanze.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/13921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 213 024 A (SEROBIOLOGIQUES LAB SA) 12 June 2002 (2002-06-12) paragraph '0027!	1
X	WO 02/45728 A (COGNIS FRANCE S A ;DANOUX LOUIS (FR); HENRY FLORENCE (FR); PAULY G) 13 June 2002 (2002-06-13) page 9, line 36 - page 10, line 4	1
X	CHARROUF Z; GUILLAUME D: "Ethnoeconomical, Ethomedical, and Phytochemical Study of Argania Spinosa (L.) Skeels: A Review" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, vol. 67, no. 1, October 1992 (1992-10), pages 7-14, XP002242296 page 9, lines 14-22	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 2004

Date of mailing of the international search report

15/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bochelen, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13921

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHARROUF Z: "TRITERPENES ET STEROLS EXTRAITS DE LA PULPE D'ARGANIA SPINOSA (L) SAPOTACEAE" PLANTES MEDICINALES ET PHYTOTHERAPIE, ANGERS, FR, vol. 25, no. 2/3, 1991, pages 112-117, XP000619575 ISSN: 0032-0994 the whole document	1
X	MAURIN R: "L'HUILE D'ARGAN ARGANIA SPINOSA (L.) SKEELS SAPOTACEAE. MISE AU POINT" O.C.L. OLEAGINEUX CORPS GRAS LIPIDES, EDITIONS JOHN LIBBEY EUROTEXT, MONTRouGE, FR, vol. 39, no. 5/6, 1 May 1992 (1992-05-01), pages 139-146, XP002037529 ISSN: 1258-8210 page 144, column 2, paragraph 3	1
A	ALAOU K ET AL: "ACTIVITE ANALGESIQUE ET ANTI-INFLAMMATOIRE DES SAPONINES D'ARGANIA SPINOSA ANALGESIC AND ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF ARGANIA SPINOSA SAPONINS" ANNALES PHARMACEUTIQUES FRANCAISES, MASSON, PARIS, FR, vol. 56, no. 5, 1998, pages 220-228, XP000995497 ISSN: 0003-4509 the whole document	1-11
A	CHARROUF Z; WIERUSZESKI J M; FKISH-TETOUANI S; LEROY Y; CHARROUF M; FOURNET B: "Triterpenoid Saponins from Argania Spinosa" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 31, no. 6, 1992, pages 2079-2086, XP001157414 the whole document	1-11
Y	TAHROUCH S ET AL: "POLYPHENOL INVESTIGATION OF ARGANIA SPINOSA (SAPOTACEAE) ENDEMIC TREE FROM MOROCCO" ACTA BOTANICA GALLICA, XX, XX, vol. 147, no. 3, 2000, pages 225-232, XP000996078 the whole document	3,4

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/13921

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HIIPAKKA R; HAN-ZHONG ZHANG; WEI DAI; QING DAI; SHUTSUNG LIAO: "Structure-activity relationships for inhibition of human 5-alpha-reductases by polyphenols" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 63, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1165-1176, XP002242332 the whole document	3,4
Y	EP 0 747 048 A (YAKURIGAKU CHUO KENKYUSHO KK) 11 December 1996 (1996-12-11) page 2 - page 3; claims 1,6	3,4
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 0182, no. 36 (C-1196), 6 May 1994 (1994-05-06) & JP 6 025211 A (MITSUBISHI KASEI CORP), 1 February 1994 (1994-02-01) abstract	3,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/13921

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1213024	A	12-06-2002	EP 1213024 A1	12-06-2002
			AU 2490302 A	18-06-2002
			BR 0115990 A	06-01-2004
			WO 0245729 A1	13-06-2002
			EP 1339421 A1	03-09-2003
			US 2004042996 A1	04-03-2004
WO 0245728	A	13-06-2002	EP 1213025 A1	12-06-2002
			AU 2795402 A	18-06-2002
			BR 0115967 A	28-10-2003
			WO 0245728 A1	13-06-2002
			EP 1347768 A1	01-10-2003
			US 2004047832 A1	11-03-2004
EP 0747048	A	11-12-1996	JP 8333272 A	17-12-1996
			JP 2838069 B2	16-12-1998
			JP 9235221 A	09-09-1997
			CA 2178528 A1	10-12-1996
			DE 747048 T1	30-04-1997
			EP 0747048 A2	11-12-1996
			US 5773005 A	30-06-1998
JP 6025211	A	01-02-1994	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/13921

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K35/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 213 024 A (SEROBIOLOGIQUES LAB SA) 12. Juni 2002 (2002-06-12) Absatz '0027!	1
X	WO 02/45728 A (COGNIS FRANCE S A ;DANOUX LOUIS (FR); HENRY FLORENCE (FR); PAULY G) 13. Juni 2002 (2002-06-13) Seite 9, Zeile 36 - Seite 10, Zeile 4	1
X	CHARROUF Z; GUILLAUME D: "Ethnoeconomical, Ethomedical, and Phytochemical Study of Argania Spinosa (L.) Skeels: A Review" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 67, Nr. 1, Oktober 1992 (1992-10), Seiten 7-14, XP002242296 Seite 9, Zeilen 14-22	1
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. April 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/04/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bochelen, D

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHARROUF Z: "TRITERPENES ET STEROLS EXTRAITS DE LA PULPE D'ARGANIA SPINOSA (L) SAPOTACEAE" PLANTES MEDICINALES ET PHYTOTHERAPIE, ANGERS, FR, Bd. 25, Nr. 2/3, 1991, Seiten 112-117, XP000619575 ISSN: 0032-0994 das ganze Dokument	1
X	MAURIN R: "L'HUILE D'ARGAN ARGANIA SPINOSA (L.) SKEELS SAPOTACEAE. MISE AU POINT" O.C.L. OLEAGINEUX CORPS GRAS LIPIDES, EDITIONS JOHN LIBBEY EUROTEXT, MONTROUGE, FR, Bd. 39, Nr. 5/6, 1. Mai 1992 (1992-05-01), Seiten 139-146, XP002037529 ISSN: 1258-8210 Seite 144, Spalte 2, Absatz 3	1
A	ALAOUI K ET AL: "ACTIVITE ANALGESIQUE ET ANTI-INFLAMMATOIRE DES SAPONINES D'ARGANIA SPINOSA ANALGESIC AND ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF ARGANIA SPINOSA SAPONINS" ANNALES PHARMACEUTIQUES FRANCAISES, MASSON, PARIS, FR, Bd. 56, Nr. 5, 1998, Seiten 220-228, XP000995497 ISSN: 0003-4509 das ganze Dokument	1-11
A	CHARROUF Z; WIERUSZESKI J M; FKISH-TETOUANI S; LEROY Y; CHARROUF M; FOURNET B: "Triterpenoid Saponins from Argania Spinosa" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), Bd. 31, Nr. 6, 1992, Seiten 2079-2086, XP001157414 das ganze Dokument	1-11
Y	TAHROUCH S ET AL: "POLYPHENOL INVESTIGATION OF ARGANIA SPINOSA (SAPOTACEAE) ENDEMIC TREE FROM MOROCCO" ACTA BOTANICA GALLICA, XX, XX, Bd. 147, Nr. 3, 2000, Seiten 225-232, XP000996078 das ganze Dokument	3,4

-/--

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	HIIPAKKA R; HAN-ZHONG ZHANG; WEI DAI; QING DAI; SHUTSUNG LIAO: "Structure-activity relationships for inhibition of human 5-alpha-reductases by polyphenols" BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, Bd. 63, Nr. 6, 15. März 2002 (2002-03-15), Seiten 1165-1176, XP002242332 das ganze Dokument	3,4
Y	EP 0 747 048 A (YAKURIGAKU CHUO KENKYUSHO KK) 11. Dezember 1996 (1996-12-11) Seite 2 - Seite 3; Ansprüche 1,6	3,4
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 0182, Nr. 36 (C-1196), 6. Mai 1994 (1994-05-06) & JP 6 025211 A (MITSUBISHI KASEI CORP), 1. Februar 1994 (1994-02-01) Zusammenfassung	3,4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/13921

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1213024	A	12-06-2002	EP 1213024 A1	12-06-2002
			AU 2490302 A	18-06-2002
			BR 0115990 A	06-01-2004
			WO 0245729 A1	13-06-2002
			EP 1339421 A1	03-09-2003
			US 2004042996 A1	04-03-2004
WO 0245728	A	13-06-2002	EP 1213025 A1	12-06-2002
			AU 2795402 A	18-06-2002
			BR 0115967 A	28-10-2003
			WO 0245728 A1	13-06-2002
			EP 1347768 A1	01-10-2003
			US 2004047832 A1	11-03-2004
EP 0747048	A	11-12-1996	JP 8333272 A	17-12-1996
			JP 2838069 B2	16-12-1998
			JP 9235221 A	09-09-1997
			CA 2178528 A1	10-12-1996
			DE 747048 T1	30-04-1997
			EP 0747048 A2	11-12-1996
			US 5773005 A	30-06-1998
JP 6025211	A	01-02-1994	KEINE	